

令和 3 年 4 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08166

研究課題名(和文)喘息気道における上皮破綻のメカニズムの解明 -ミトコンドリア機能から迫る-

研究課題名(英文)Role of mitochondrial dysfunction in epithelial barrier disruption

研究代表者

市川 朋宏 (Ichikawa, Tomohiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20405450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は喘息病態としてダニ抗原による気道上皮細胞の機能破綻におけるミトコンドリア新生の役割を検討した。ダニ抗原を気道上皮細胞に投与するとミトコンドリア新生の主要な調節因子であるPGC-1の発現が低下するとともに、E-cadherinとZO-1などの細胞間結合蛋白の発現が減少し、経上皮細胞抵抗の低下を認めた。さらにミトコンドリア量の減少も認めた。PGC-1の活性化剤であるSRT1720を投与するとダニ抗原による気道上皮細胞の機能低下が抑制された。本研究の結果によりPGC-1を標的とした治療戦略が新たな気管支喘息の治療法になり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は喘息病態として代表的なアレルゲンであるダニによる気道上皮障害のメカニズムをミトコンドリア新生という今までにない切り口から検討したものである。その中でミトコンドリア新生の主要な調節因子であるPGC-1がダニ抗原による気道上皮障害に関与していることを示し、PGC-1の活性化作用を持つSRT1720がダニ抗原による気道上皮障害を改善させる作用を持つことが明らかになった。これらの結果から、PGC-1を標的とした喘息の新規治療戦略が有用である可能性が示唆され、さらに気道上皮機能の回復という今までにない治療薬の開発の基礎になる可能性もあり、本研究は今後の喘息治療の発展に意義のあるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify whether the peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1), a central regulator of mitochondrial biogenesis, is involved in the disruption of the airway barrier function induced by aeroallergens. BEAS-2B cells were exposed to house dust mite (HDM) and the expressions of PGC-1 and E-cadherin were examined by immunoblotting. The effect of SRT1720, a PGC-1 activator on E-cadherin expression and transepithelial electrical resistance (TEER) in the HDM-exposed BEAS-2B cells were investigated. The amounts of PGC-1 and E-cadherin in the HDM-treated cells were significantly decreased compared to the vehicle-treated cells. SRT1720 restored the expressions of PGC-1 and E-cadherin reduced by HDM in BEAS-2B cells. Treatment with SRT1720 also significantly ameliorated the HDM-induced reduction in TEER. In conclusion, the current study demonstrated that HDM disrupted the airway barrier function through the PGC-1-dependent pathway.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：気管支喘息 アレルギー ダニ 気道上皮細胞 ミトコンドリア新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気道を構成する細胞の中でも気道上皮細胞は、微生物や有毒ガス、アレルゲンなど多種多様な外的因子に暴露されており、気道内の構造や機能を正常に維持するためのバリアとして機能する。しかし喘息の気道上皮細胞はそのバリアが、構造的にも機能的にも破綻している。例えば上皮細胞間の tight junction の破綻による細胞の剥離や杯細胞などムチン産生細胞への分化によりバリア機能が障害されると考えられる。その結果、外界のアレルゲンや有害物質、ウイルスなどが容易に気道粘膜の基底膜下層に侵入可能となる。侵入したこれらの抗原に対して樹状細胞やT細胞など免疫担当細胞が反応し、免疫応答が活性化され気道炎症が生じる。さらに気道上皮細胞はToll様受容体(TLRs)をはじめ、様々な pattern recognition receptors (PRRs) を発現しており、微生物やアレルゲン、ストレスなど様々な刺激に対して PRRs を介して防御的に応答する。しかし喘息の気道上皮細胞では PRRs を介した反応が亢進しており、炎症反応の遷延や組織障害を引き起こす。(Parsons et al. Clin Exp Allergy 2014) このように気道上皮細胞の機能異常は、喘息の病態に重要な役割を果たしているが、上皮細胞の機能障害のメカニズムは未だに明らかにされていない。

ミトコンドリアは ATP を産生することで細胞のエネルギー源としての役割を果たしているが、それと同時に活性酸素種(ROS)も生成する。ROS は酸化ストレスの原因となり、細胞や組織障害を引き起こすが、生体は抗酸化作用を有することでこれに対応する。また損傷を受けたミトコンドリアの蓄積は過剰な ROS の産生を引き起こすため、障害を受けたミトコンドリアはマイトファジーの機構により除去され、ミトコンドリア新生により正常なミトコンドリアの生成が生じ、生体内でホメオスタシスを保っている。しかし呼吸器疾患や心血管系疾患、神経筋疾患など様々な疾患では、マイトファジーやミトコンドリア新生に障害を来していることや、ミトコンドリア自体にも形態学的変化や機能障害が生じていることが知られており、ミトコンドリアの障害が喘息の病態に関与している可能性がある。気管支喘息の気道平滑筋細胞では健常人の細胞に比べミトコンドリア新生が亢進しており、気道平滑筋の肥厚につながる可能性が報告されている。(Triani et al. JEM 2007) 一方で、IL-4 が気道上皮細胞のミトコンドリア新生を減少させることも報告されており(Pattanaik et al. JACI 2016)、気管支喘息におけるミトコンドリアの役割が細胞腫で異なる可能性がある。しかし喘息の病態において、ミトコンドリア機能障害が気道上皮細胞にどのような影響を与えるかの詳細は不明である。

以上の背景より、外界に対する免疫応答の最前線である気道上皮細胞のミトコンドリアの機能の変化や障害が、気管支喘息の発症や病態に関与している可能性が示唆される。未だにその全貌が解明されていない気管支喘息の病態を、気道上皮細胞とミトコンドリアに焦点を当て明らかにしていくことは非常に興味深く、さらに将来の臨床応用にも有用であると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、気管支喘息の気道上皮細胞の障害のメカニズムをミトコンドリア異常の観点から明らかにすることを目的とする。具体的には(1) 喘息由来の気道上皮細胞におけるミトコンドリア機能が健常細胞と違いがみられるかどうか、(2) ミトコンドリアの機能障害が気道上皮細胞のバリア機能や免疫応答さらには喘息関連メディエーター産生(IL-25, IL-33, TSLP など)を促進するか否か、(3) ミトコンドリア異常のある気道上皮細胞が他の気道細胞(線維芽細胞及び平滑筋細胞)にどのような影響を及ぼすか、これらを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 気管支喘息と健常者の気道および気道上皮細胞におけるミトコンドリア機能の比較

気管支鏡下もしくは手術肺より採取した気道組織で下記ミトコンドリア新生マーカーの発現を免疫染色で比較した。また健常人及び喘息患者より単離した気道上皮細胞においても同様に下記マーカーの発現をウエスタンブロッティング法(WB)にて測定した。

・ミトコンドリア新生マーカー：NRF-1, PGC1 α , TFAM

(2) ダニ抗原による気道上皮細胞障害モデルでの検討

気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞及びプライマリー気道上皮細胞にダニ抗原抽出液(HDM)を投与し、先述したミトコンドリア関連マーカー及び上皮細胞間の結合蛋白である E-cadherin, ZO-1 の発現を WB 法で測定した。さらに PGC-1 α 活性作用を持つ SRT1720 を前投与し HDM 誘導性の蛋白発現の変化に及ぼす影響を検討した。上皮機能については経上皮細胞抵抗(TEER)を Millipore 社の Millicell ERS-2 を用いて測定した。またメカニズムを検討するため TLR4 の受容体阻害薬である LPS-RS、PAR-2 受容体の阻害薬である GB83、プロテアーゼ阻害薬である E64 および AEBSF の効果も合わせて検討した。ミトコンドリアについては細胞内のミトコンドリアの量を MitoTracker を蛍光標識として測定した。

4. 研究成果

(1) 喘息と健常者由来の気道上皮細胞におけるミトコンドリア新生マーカーの発現の比較
 健常者および喘息患者由来の気道上皮細胞を初代培養したものおよび市販の培養細胞における PGC-1 α 、NRF-1、TFAM の発現量を WB 法で測定したところ、健常者由来細胞に比較して喘息由来細胞においてこれらの発現が有意に減少していた (図 1)。

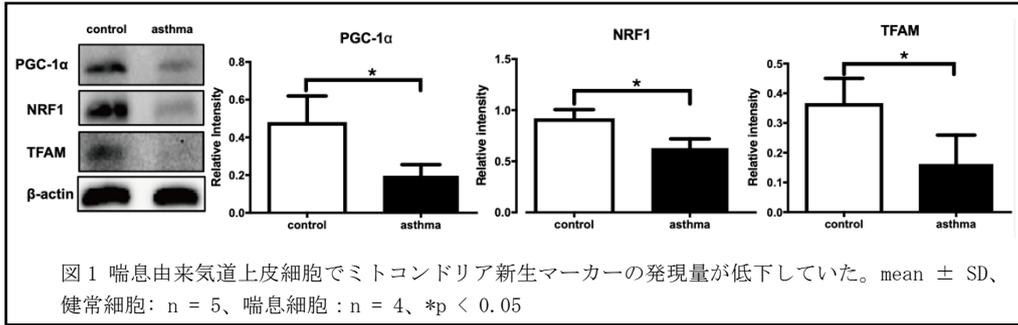


図 1 喘息由来気道上皮細胞でミトコンドリア新生マーカーの発現量が低下していた。mean \pm SD、健常細胞: n = 5、喘息細胞: n = 4、*p < 0.05

(2) ダニ抗原による気道上皮細胞とマウス肺におけるタンパク発現の検討

次に気管支喘息における主要な吸入アレルゲンであるダニ抗原の抽出物 (HDM) を気道上皮細胞株の BEAS-2B 細胞に投与し、PGC-1 α 、TFAM の発現を解析したところ HDM によりこれらのタンパクの発現量が有意に低下した (図 2a, b)。さらに気道上皮バリア機能の維持に重要な細胞間結合タンパクである E-cadherin および ZO-1 の発現量も低下した (図 2c, d)。

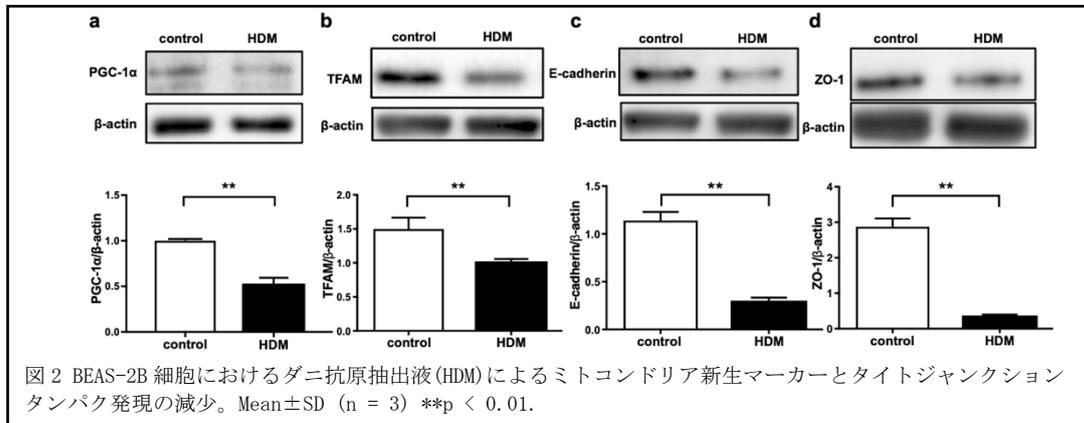


図 2 BEAS-2B 細胞におけるダニ抗原抽出液 (HDM) によるミトコンドリア新生マーカーとタイトジャンクションタンパク発現の減少。Mean \pm SD (n = 3) **p < 0.01.

(3) 脱アセチル化酵素 SRT1720 による PGC-1 α の活性化と HDM 誘導性気道上皮機能障害の回復
 PGC-1 α はミトコンドリア新生の主要な調節因子であるが、脱アセチル化およびリン酸化により活性化される。ここでは、

脱アセチル化活性を持つ SRT1720 を用いてこれまで見られた HDM によるタンパク発現の変化に対して SRT1720 がどのような影響を及ぼすのか、BEAS-2B 細胞を用いて検討を行なった。SRT1720 で全処理をしておくと、HDM により低下した PGC-1 α の発現量が低下した (図 3a, b)。さらに、HDM による TFAM と E-cadherin の低下も SRT1720 により回復した (図 3c, d)。細胞間結合タンパクいわゆるタイトジャンクション蛋白が破綻すると気道上皮のバリア機能が低下するが、TEER を測定することで SRT1720 のバリア機能に対する評価も行なった。プライマリーヒト気道上皮細胞に HDM を投与すると TEER が低下するが、SRT1720 を前投与しておくとも HDM による TEER の低下が改善した (図 3e)。以上の結果によ

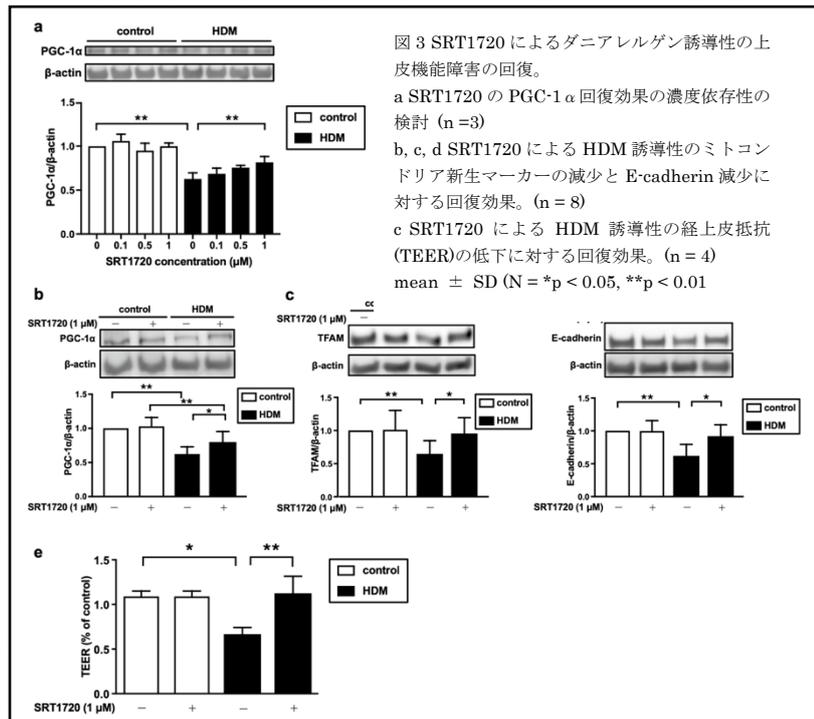


図 3 SRT1720 によるダニアレルゲン誘導性の上皮機能障害の回復。

a SRT1720 の PGC-1 α 回復効果の濃度依存性の検討 (n = 3)

b, c, d SRT1720 による HDM 誘導性のミトコンドリア新生マーカーの減少と E-cadherin 減少に対する回復効果。(n = 8)

e SRT1720 による HDM 誘導性の経上皮抵抗 (TEER) の低下に対する回復効果。(n = 4) mean \pm SD (N = *p < 0.05, **p < 0.01)

リダニ抗原は気道上皮においてタイトジャンクションを破綻させるが、それと並行してミトコンドリア新生のマーカーを減少させること、さらにミトコンドリア新生を回復させるとダニアレルギーによる上皮機能障害も回復する可能性が示唆された。

(4) HDM および SRT1720 のミトコンドリア量に対する影響の検討

これまでの結果を元に、実際にミトコンドリアの量がどのように変化するかをミトコンドリア特異的プローブである MitoTracker を用いて BEAS-2B 細胞におけるミトコンドリア量を解析した。HDM を細胞に投与すると E-cadherin (図 4a)、ZO-1 (図 4b) の細胞における発現が減弱し、ミトコンドリア量が減少するが(図 4a, b)、SRT1720 を投与しておくくと E-cadherin と ZO-1 の減少が抑制されミトコンドリア量の減少も回復した (図 4a, b)。

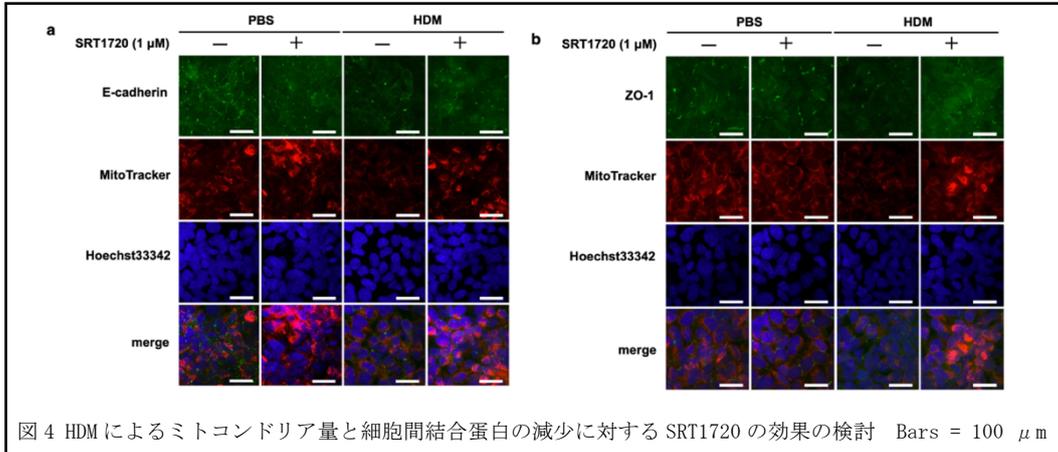


図 4 HDM によるミトコンドリア量と細胞間結合蛋白の減少に対する SRT1720 の効果の検討 Bars = 100 μm

(5) メカニズムの検討 1: 受容体の検討

ダニ抗原にはリポポリサッカライド(LPS)や さまざまなプロテアーゼが含まれており、これらが受容体を介して炎症や免疫応答を引き起こす。LPS は to11 様受容体 (TLR)4 を、プロテアーゼは protease-activated receptor-2 (PAR-2) に対するリガンドとなる。TLR4 阻害剤である TLR-RS と PAR-2 阻害剤である GB83 を用いて、HDM によるミトコンドリアとバリア機能障害にどの受容体が関与するかを検討した。興味深いことに、図 5 に示すようにいずれの阻害剤も HDM による PGC-1α とタイトジャンクションタンパクの発現低下に対し改善効果を示した。

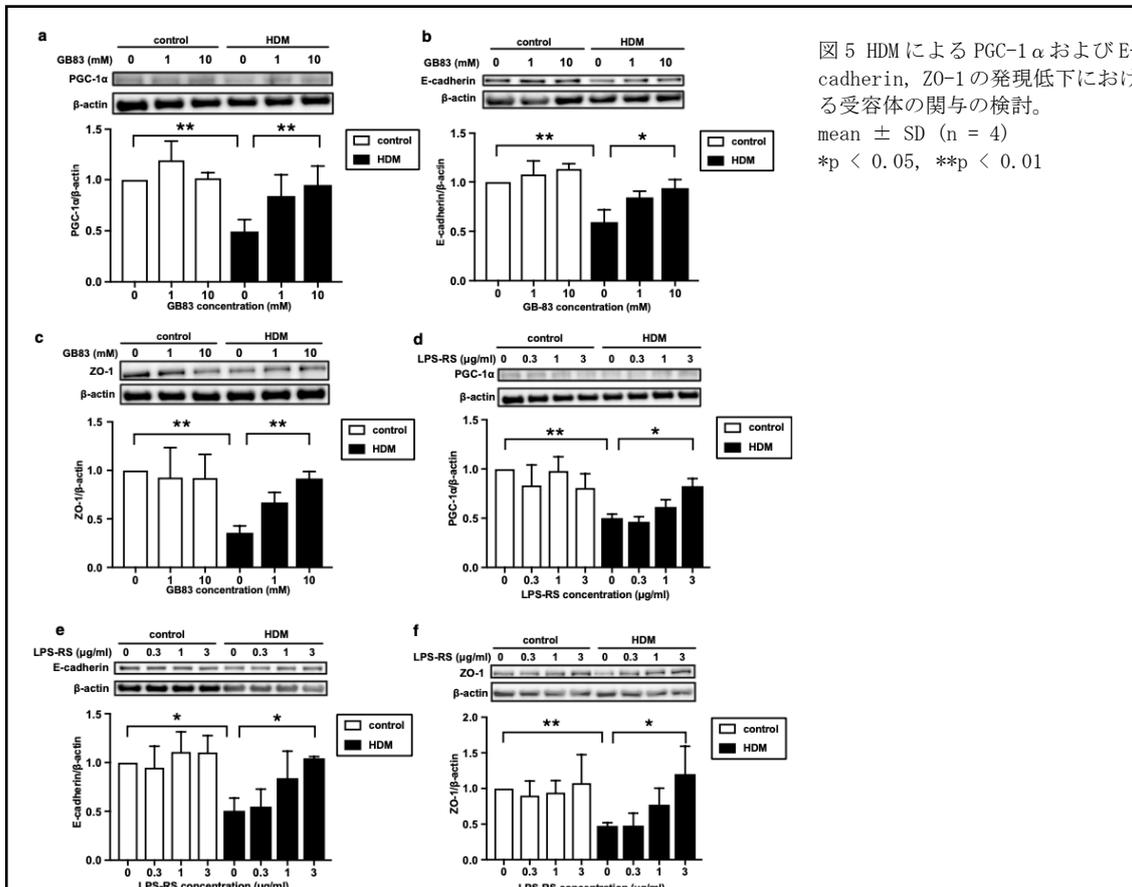


図 5 HDM による PGC-1α および E-cadherin, ZO-1 の発現低下における受容体の関与の検討。 mean ± SD (n = 4) *p < 0.05, **p < 0.01

(6) メカニズムの検討2：プロテアーゼの関与についての検討

ダニ抗原に含まれるプロテアーゼにはシステインプロテアーゼとセリンプロテアーゼがあり、これらが PAR-2 を活性化させる。プロテアーゼの関与を検討するためにシステインプロテアーゼ阻害剤である E64 とセリンプロテアーゼである AEBSF の効果を BEAS-2B 細胞を用いて検討した。いずれのプロテアーゼ阻害剤も HDM による PGC-1 α の発現低下(図 6a, c)および E-cadherin の発現低下(図 6b, d)に対して改善効果を認めた。

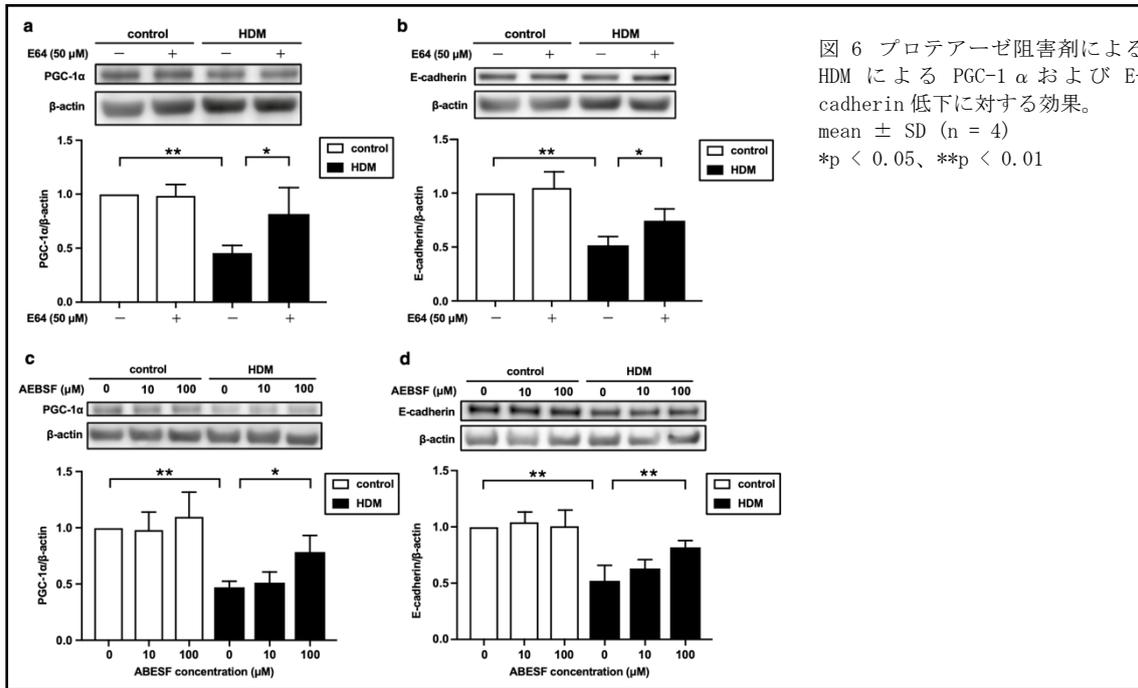


図 6 プロテアーゼ阻害剤による HDM による PGC-1 α および E-cadherin 低下に対する効果。mean \pm SD (n = 4) *p < 0.05, **p < 0.01

(7) 結果のまとめ

本研究の結果により、吸入アレルゲンであるダニ抗原による気道上皮バリア機能障害において自然免疫応答とミトコンドリア新生障害が関連していることが示された。特に本研究で示された PAR2/TLR4/PGC-1 α を介した経路が、上皮バリア機能障害の回復という今までにない喘息の新規治療戦略のターゲットとなりうることを示唆された。図 7 に本研究の結果想定されるメカニズムの模式図を示す。

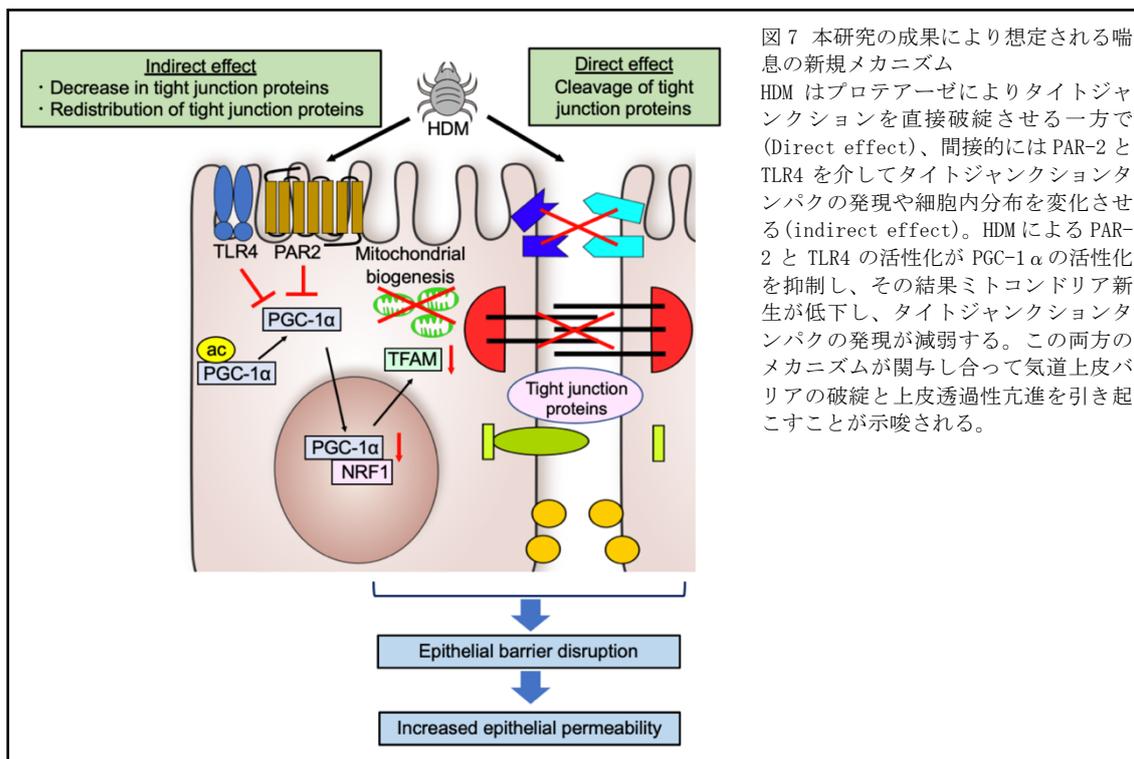


図 7 本研究の成果により想定される喘息の新規メカニズム HDM はプロテアーゼによりタイトジャンクションを直接破綻させる一方で (Direct effect)、間接的には PAR-2 と TLR4 を介してタイトジャンクションタンパクの発現や細胞内分布を変化させる (indirect effect)。HDM による PAR-2 と TLR4 の活性化が PGC-1 α の活性化を抑制し、その結果ミトコンドリア新生が低下し、タイトジャンクションタンパクの発現が減弱する。この両方のメカニズムが関与し合って気道上皮バリアの破綻と上皮透過性亢進を引き起こすことが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Tsutomu, Ichikawa Tomohiro, Numakura Tadahisa, Yamada Mitsuhiko, Koarai Akira, Fujino Naoya, Murakami Koji, Yamanaka Shun, Sasaki Yusaku, Kyogoku Yorihiro, Itakura Koji, Sano Hirohito, Takita Katsuya, Tanaka Rie, Tamada Tsutomu, Ichinose Masakazu, Sugiura Hisatoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 PGC-1 regulates airway epithelial barrier dysfunction induced by house dust mite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-021-01663-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤 勉, 市川 朋宏 ほか7名
2. 発表標題 気管支喘息における気道上皮細胞の機能障害とミトコンドリア新生の役割に関する検討
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Saito, Tomohiro Ichikawa, et al
2. 発表標題 The Decrease of Mitochondrial Biogenesis Contributes to Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Asthma
3. 学会等名 ATS international conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Ichikawa, Tsutomu Saito et al.
2. 発表標題 The decrease of mitochondrial biogenesis contributes to airway epithelial barrier dysfunction in asthma
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会 (English session)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------